FACULTE de MEDECINE de PARIS

Année 1962

N° 398

T H E S E

pour le

DOCTORAT en MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

WAKS Marcel

né le, 7 Mai 1930 à Zgierz (Pologne)

Présenté et soutenue publiquement le 1962

ETUDE et COMPARAISON de METHODES de DOSAGE de L'HAPTOGLOBINE

Président : Mr le Professeur M. F. JAYLE.

FACULTE de MEDECINE de PARIS

Année 1962 N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT en MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

WAKS Marcel

né le, 7 Mai 1930 à Zgierz (Pologne)

Présenté et soutenue publiquement le 1962

ETUDE et COMPARAISON de METHODES de DOSAGE de L'HAPTOGLOBINE

Président : Mr le Professeur M. F. JAYLE.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

1.10.1960

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Aubin (A.), Bénard (H.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Champy (C.), Debré (R.), Gastinel (P.), Guillain (G.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Loeper (M.), Marion (G.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Olivier (E.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis, Richet (C.), Strohl (A.), Tanon (L.).

DOYEN..... Léon BINET
Membre de l'Institut

ASSESSEUR..... Jean VERNE.

I.-- PROFESSEURS

		M.M.
Anatomie		DELMAS (A.)
Anatomie pathologique		DELARUE (J.)
Anesthésiologie		BAUMANN (J.)
Biochimie médicale		JAYLE (M.F.)
" "	(Professeur à titre personnel)	ETTORI (J.)
" "	(Professeur à titre personnel)	SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports		Challey-Bert (P.)
Biologie médicale		FAUVERT (R.)
" "	(Professeur à titre personnel)	BOURLIERE (F.)
Cancérologie médicale et sociale		BERNARD (J.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
Clinique cardiologique	(Broussais)	MOUQUIN (M.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	SICARD (A.)
	Cochin	N.
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Pitié	CORDIER (G.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	Moulonguet (P.)
	Tenon	Lortat-Jacob (J.L.)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549214_0016

linique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades).....FEVRE (M.)
linique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)..... Merlé d'Aubigné (R.)
linique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais).....Gaudart-d'Allaines (F. de)
linique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec).....MATHEY (J.)
linique endocrinologique (Pitié)..... DECOURT (J.)
linique de génétique médicale (Enfants-Malades)..... LAMY (M.)
linique de gynécologique (Broca)..... Funck - Brentano (P.)
linique des maladies cutanées et syphilitiques (St-Louis)..... DEGOS (R.)
linique des maladies des enfants (Enfants-Malades)..... CATHALA (J.)
linique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)..... MOLLARET (P.)
linique des maladies mentales et de l'encéphale (Ste-Anne)..... DELAY (J.)
linique des maladies métaboliques (Necker)..... HAMBURGER (J.)
linique des maladies du sang (Broussais)..... MARCHAL (G.)
linique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)..... N.

iniques Médicales.....
- Boucicaut..... LENEGRE (J.)
- Broussais..... SOULIE (P.)
- Cochin.....Justin-Besançon (L.)
- Cochin..... BROUET (G.)
- Hôtel-Dieu..... BARIETY (M.)
- Pitié..... DREYFUS (G.)
- St-Antoine..... KOURILSKY (R.)

inique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)... DEBRAY (C.)
inique médicale propédeutique (Broussais)..... GENNES (L. de)
linique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel Dieu)..... DEROT (M.)
linique de neuro-chirurgie (Pitié).....DAVID (M.)
linique neurologique (Salpêtrière).....GARCIN (R.)

liniques obstétricales.....
- Baudelocque ..... LACOMME (M.)
- Fosch (Suresnes)..... MERGER (R.)

liniques obstétricales et gynécologique (Port-Royal)..... VARANGOT (J.)

linique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)..... RENARD (G.)
linique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)..... AUBRY (M.)
linique de pédiatrie et de puériculture (St-Vincent de Paul)..... LELONG (M.)
linique de pédiatrie Sociale (Enfants-Malades)..... MARIE (J.)
linique de pneumo-phtisiologie (Laënnec)..... BERNARD (E.)
linique psychiatrique infantile (Salpêtrière)..... MICHAUX (L.)
linique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)..... COSTE (F.)
linique stomatologique (Pitié)..... DECHAUME (M.)
linique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)..... N.
linique thérapeutique médicale (St-Antoine)..... LEMAIRE (A.)
linique urologique (Cochin)..... N.
mbryologie..... GIROUD (A.)
" (Professeur à titre personnel)..... Tuchmann-Duplessis (H.)
istoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)..... SEZE (S. de)
istologie..... VERNE (J.)
ygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)..... TURPIN (R.)
ygiène et médecine préventive..... JOANNON (P.)
" (Professeur à titre personnel)..... DEPARIS (M.)
[édecine du Travail..... DESOILLE (H.)
[édecine légale..... Piédelièvre (R.)
[icrobiologie (Bactériologie et virologie)..... FASQUELLE (R.)
arasitologie..... GALLIARD (H.)
(Professeur à titre personnel)..... BRUMPT (L.C.)
athologie chirurgicale..... COUVELAIRE (R.)
" (Professeur à titre personnel)..... LAURANCE (G.)
athologie exotique..... LAVIER (G.)
athologie expérimentale et comparée..... MERKLEN (F.P.)
athologie médicale..... MILLIEZ (P.)
athologie respiratoire..... TURIAF (F.)

athologie et thérapeutique générales..... BOUDIN (J.)

harmacologie..... CHEYMOL (J.)

" (Professeur à titre personnel)..... LEVY (Mlle J.)

hysiologie..... BINET (L.)

" (Professeur à titre personnel)..... BARGETON (D.)

" (Professeur à titre personnel)..... PARROT (J.)

hysiologie et pathologie obstétricale..... LEPAGE (F.)

hysique médicale..... DOGNON (A.)

" " (Professeur à titre personnel)..... DJOURNO (A.)

adiologie Médicale..... DESGREZ (H.)

echnique chirurgicale et Chirurgie expérimentale..... LEGER (L.)

hérapeutique..... CONTE (M.)

II. --PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES ET MAITRES DE CONFERENCES --AGREGES

NATOMIE

CABROL (C.)
COUINAUD (C.)
OLIVIER (G.)

Gauthier-Villars (MllePL.)

natomie Pathologique

(pr. s. ch.)
BUSSER
GOUYGOU (Ch.)
ORCEL (L.)
PAILLAS (J.)

nesthésiologie..... VOURC'H (G.)

actériologie.....

BARBIER (P.)
CHRISTOL (D.)
TOURNIER (P.)

ochimie médicale

Desgrez (P.) pr s ch.
Polonoski (J:) m; conf.

Ophtalmologie..... BREGEAT (P.)
SARAUX (H.)

Orthopédie..... JUDET (R.)
RAMADIER (J.)

Oto-rhino-Laryngologie DEBAIN (J.)

Parasitologie..... CHABAUD (A.)

Pathologie chirurgicale

BARCAT (J.)
BINET (J.P.)
CAUCHOIX (J.)
CHATELIN (C.L.)
DUBOST (Ch.)
DUBOST (Cl.)
FAUREL (J.)
FLABEAU (F.)
GERMAIN (A.)
LOYGUE (J.)
MERCADIER
PERROTIN (J.)
ROBERT (H.)
THOMERET (G.)

iologie appliquée à l'Education hysique et aux Sports	PLAS (F.)
arcinologie	DENOIX (P.)
	MATHE (G.)
ermato-Syphiligraphie	DUPERRAT(B)
lectro-Radiologie.....	Ledoux-Lebard(G.)
ématologie.....	Bilski-Pasquier (G.)
	DAUSSET (J.)
istologie.....	Coujard (R.) pr s ch
	MAROIS (M.)
	RACADOT (J.)
ydrologie.....	CORNET (A.)
ygiène.....	BOYER (J.) pr s ch
	Corre-Hurst (Mme L.)
aladies infectieuses	BASTIN (R.)
	DUPONT (V.)
	Derobert (L;) pro s ch
	HADENGUE (A.)
édecine légale.....	FOURNIER (E.)
	GUENIOT (M.)
édecine du travail.....	ALBAHARY (C.)
eurologie.....	LHERMITTE (F.)
	GRANJON (A.)
	HERVET (E.)
	LE LORIER (G.)
bstétrique.....	MORIN (P.)
	MUSSET (R.)
	ROBEY (M.)
	Thoyer Rozat (J.)

Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
	CROSNIER (J.)
	HARTMANN (L.)
Pathologie	LOEPER (J.)
	MAURICE (J.)
Expérimentale	RICHET (G.)
	AUSSANNAIRE (M.)
	BOUR (H.)
	BOUVIER (J.)
	BOUVRAIN (Y.)
	BRICAIRE (H.)
	BRISSAUD (H.)
	BROCARD (H.)
	BUGE (A.)
	Castaigne (P) m conf
	CATINAT (J.)
	CONTAMIN (F.)
Pathologie médicale	COURY (C.)
	FREZAL (J.)
	HOUSSET (E.)
	LAROCHE (Cl.)
	LESOBRE (R.)
	MACREZ (C.)
	NICK (J.)
	Pequignot (H) pr s ch
	ROYER (P.)
	WOLFROMM (R.)

	JOSEPH (R.)
	MANDE (R.)
édiatrie-Puériculture	Mozziconacci (P.)
	POLONOVSKI (C.)
	ROSSIER (A.)
harmacologie.....	BOISSIER (J.)
	LECHAT (P.)
hysiologie.....	DEJOURS (P.)
hysique médicale	Gougerot (L.) M conf. pr. s. ch.
	KELLERSHOHN

Pneumo phtisiologie.....	KREIS (B.)
Psychiatrie.....	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile.....	DUCHE (D.)
Rhumatologie.....	DELVARRE (F.)
	CERNEA (P.)
Stomatologie	Chaput (MmeA.) m c agr.
	GRELLET (M.)
Thérapeutique.....	CHASSAGNE (P.)
	LAMOTTE (M.)
Urologie.....	QUENU (L.)

III --PROFESSEURS SANS CHAIRES ET AGREGES

CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
à titre permanent.

natomie.....	DEBEYRE
	ABOULKER (P.)
	Ameline (A) pr. s. ch.
	HUGUIER (J.)
	OLIVIER (C.)
linique chirurgicale	PADOVANI (P;)
	POILLEUX (F.)
	ROUX (M.)
	VERNE (J.M.)
	DOMART (A.)
	PERRAULT (M.)
linique médicale	RAMBERT (P.)
	THIEFFRY (S.)

Clinique obstétricale	GRASSET (J.)
	MAYER (M.)
	RAVINA (J.)
Clinique ophtalmologique	DESVIGNES (P.)
	OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique.....	MADURO (R.)
Clinique pédiatrique et puériculture.....	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique...;	BARUK (H.)
Clinique urologique.....	KUSS (R.)
Médecine légale.....	GAULTIER

IV --PROFESSEURS DETACHES
DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie..... [illegible] Ch.

Pathologie chirurgicale..... RUDLER (J.) Pr. s. Ch.

- CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

BOLTANSKI (E.)

LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté..... M. LENA

Secrétaires..... Mme BEURLAND (H.) ; Melle CHAINTREUIL (G.)
Mme ROCHE (L.)

Conservateur en Chef..... M. le Docteur HAHN (A.)

Conservateur..... Melle DUMAITRE (P.)

Bibliothécaires..... Mmes CONTET (J.) ; FORGET (F.)
Melle LAURANT (H.) ; LE NOIR (G.) ; QUIEVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A Monsieur le Professeur M. F. JAYLE

Qui a bien voulu m'accueillir dans son service, m'indiquer un sujet de thèse dans une voie qu'il a lui-même ouverte et m'aider de ses conseils si pertinents.
Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma gratitude pour la compréhension qu'il m'a toujours témoignée.

Au R. P. J. MORETTI

Maître de Recherche au C. N. R. S.

qui a guidé ce travail avec
patience, amitié, attention.
Qu'il trouve ici l'expression
de ma reconnaissance sincère
pour toute son aide.

A Monsieur le Professeur G. LAURENCE

qui nous enseignait aussi
l'usage pascalien des
antibiotiques.

A Monsieur OLIVIER CLEMENT

pour l'amitié ancienne

Ce qui se ternit
Sans que les apparences
Ne le trahissent
C'est la fleur qui est au coeur
Des hommes de ce monde

Attribué à la poétesse Ono no Komashi
Kokinshû XV, XIV siècle

PLAN

INTRODUCTION

LA COMBINAISON HAPTOGLOBINE-HEMOGLO

1°- Travaux antérieurs

2°- Travaux personnels

a- Méthodes utilisées ; unités

b- Etude de la formation du complexe

c- Influence du pH et de la nature du tampon sur l'activité du complexe

d- Influence de l'état de l'hémoglobine sur l'activité du complexe.

COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS PAR LES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE

a- Leurs avantages et inconvénients

b- Comparaison des résultats

CONCLUSIONS

INTRODUCTION

L'ignorance qui estoit naturellement
en nous, nous l'avons, par longue
estude, confirmée et avérée.

MONTAIGNE.

En 1938, Polonovski et Jayle, (1) au cours d'une études des propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine, remarquèrent que l'addition de sérum humain normal à de l'hémoglobine augmentait son activité peroxydasique vis à vis du système IK -H_2O_2 ou IK-C_2H_5OH. Cette activation était généralement encore plus élevée si, au lieu d'un sérum normal, on ajoutait un sérum pathologique.

Pour expliquer ce fait, M. F. JAYLE (2) émit l'hypothèse suivante : le sérum contiendrait une protéine susceptible de se fixer sur l'hémoglobine, protéine dont le taux serait plus élevé dans les sérums pathologiques que dans le sérum normal et qui exalterait les propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine. Il appela cette protéine Haptoglobine (du grec hapto = je me fixe sur (Hp).

Des recherches ultérieures confirmèrent cette hypothèse;elles établirent que haptoglobine et hémoglobine s'unissaient molécule à molécule pour former un complexe très stable (3) .

En 1947, Jayle et Gillard (4) remarrquèrent que l'haptoglobine ne précipitait pas toujours dans les mêmes conditions de concentration par le sulfate d'ammonium. Ce fait les conduisit à penser qu'il existait deux sortes d'haptoglobine qu'ils appelèrent Hp I et Hp II. Depuis lors, les haptoglobines ont été isolées à l'état pur, d'abord d'une urine de néphrotique (5), puis du sérum et des liquides d'ascite. Leurs propriétés physiques et chimiques ont été étudiées. (6,7,8.).

Hp I précipite entre 52 et 62 % de saturation.

Hp II précipite entre 40 et 51 % de saturation.

En 1955, Smithies (9), grâce à l'électrophorèse à travers gel d'amidon, a classé les sérums humains en trois groupes d'après la mobilité électrophorétique des protéines sériques susceptibles de s'unir à l'hémoglobine. Des études portant sur les membres de plusieurs familles le conduisirent à découvrir l'existence de deux gènes hp_1 et hp_2 qui rendent compte de l'apparition de trois phénotypes :

-les individus homozygotes hp_1 et hp_2 ne possèdent que l'haptoglobine du type I ou Hp 1-1 ;

-les individus homozygotes hp_2-hp_2 ne possèdent que l'haptoglobine du type II ou Hp 2-2 ;

-enfin, les individus hétérozygotes hp1-hp_2 offrent un phénotype différent des deux autres, mais contenant les deux sortes d'Hp : c'est le phénotype Hp 2-1. (Fig. 1).

Le taux normal de l'Hp est compris entre 0,5 et 1,5 g/litre de plasma. En France le chiffre de 1,1 g/l est le plus fréquent.

Ce taux varie avec les affections pathologiques . Il augmente dans tous les états inflammatoires aigus ou chroniques. Il diminue et atteint parfois zéro dans les états hémolytiques. En effet, dès que Hb est libéré dans le sang circulant, elle se fixe sur Hp et l'organisme élimine rapidement le complexe Hb-Hp dans la circulation.

Ces quelques indications montrent l'importance que présente en clinique la détermination du taux de l'haptoglobine.

Il existe actuellement quatre méthodes différentes de dosage de Hp. Elles utilisent toutes les quatre la propriété que possède Hp de se fixer sur Hb. Deux d'entre elles dosent Hp par la mesure de l'activité peroxydasique du complexe Hb-Hp, les deux autres reposent sur la détermination de la quantité de Hp nécessaire pour saturer une quantité connue de Hb.

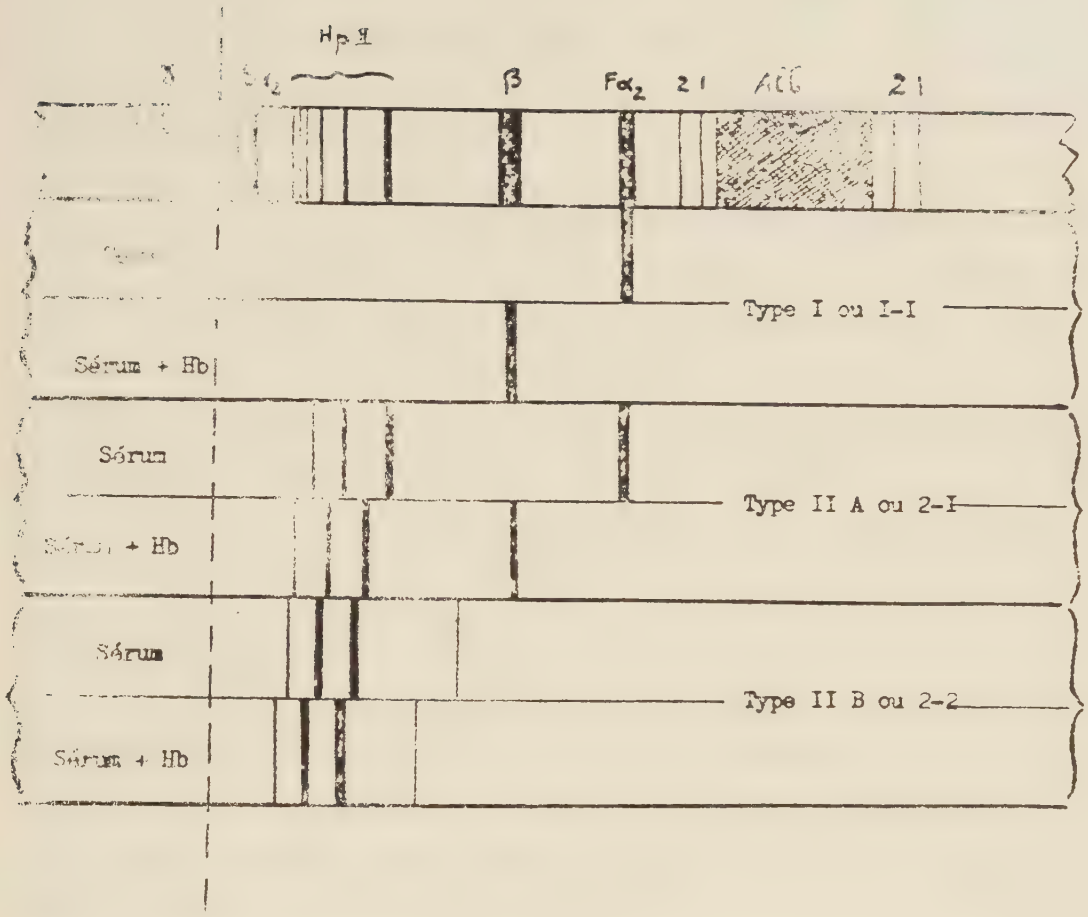

Figure I. - Electrophorèse en gel d'amidon d'un sérum normal et des différents types d'Haptoglobine et de leurs complexes avec l'Hémoglobine.

(Représentation schématique)

De haut en bas :

Sérum du groupe II.

Haptoglobine du type I et son complexe

Haptoglobine du type 2-I et ses complexes

Haptoglobine du type 2-2 et ses complexes

Ce sont :

1°- La méthode de saturation (Jayle) : à un volume fixe de Hb on ajoute des quantités croissantes de sérum jusqu'à saturation de Hb.

2° - La méthode d'activation (Jayle) : on détermine l'activité peroxydasique du complexe formé par un volume donné de sérum ajouté à une quantité fixe de Hb.

3° - La méthode électrophorétique (Nyman) : à un volume fixe de sérum, on ajoute des quantités croissantes de Hb jusqu'à mise en évidence de l'excès de Hb par électrophorèse sur papier.

4° - Enfin la méthode cinétique (Smithies) : on mesure la vitesse de réaction du complexe Hb-Hp dans un système oxydant ; entre certaines limites, cette vitesse est fonction de la concentration en Hp.

Nous exposerons plus en détail ces quatre méthodes. Mais déjà, sur l'énoncé si sommaire de leur principe, on constate qu'elles utilisent des phénomènes assez différents. Dès lors, rien n'indique, a priori, qu'elles doivent donner des résultats identiques. Etant donné l'importance croissante que prend, en clinique, la détermination du taux de Hp, nous avons estimé necessaire de comparer ces quatre méthodes. Pour un sérum déterminé, donnent-elles toutes le même taux de Hp ? Et si non, quelle est la raison de cette divergence ?..

Comme on le verra plus loin, dans les quatre méthodes étudiées, on opère dans des tampons différents, à des pH différents. Or, Jayle (2) l'a déjà montré, la formation du complexe Hb-Hp et son activité peroxydasique sont influencées par le milieu et son pH. D'autre part, deux méthodes utilisent l'Hb humaine ; les deux autres l'Hb de cheval. Malgré ces deux changements (nature de Hb, nature du tampon) les qutre méthodes restent-elles comparables ?

C'est pour tenter de répondre à ces diverses questions que nous avons entrepris cette étude. Dans ce travail, nous avons comparé les résultats donnés par les quatre méthodes de dosage appliquées à des sérums pathologiques. Ces quatre méthodes utilisent la propriété de Hp de s'unir à Hb. C'est pourquoi, dans une première partie, nous avons d'abord

étudié les facteurs qui modifient la formation du complexe et son activité peroxydasique. La comparaison des méthodes fait l'objet de la seconde partie.

LA COMBINAISON HEMOGLOBINE-HAPTOGLOBINE

Avant d'exposer nos recherches sur les facteurs qui modifient la formation et l'activité du complexe, rappelons d'abord l'état des connaissances antérieures sur ce point.

1°)-TRAVAUX ANTERIEURS

Le poids moléculaire de Hp I est voisin de 100.000 . celui du complexe Hb-Hp est de 166.000. Ces deux protéines, Hb et Hp, s'unissent donc molécule à molécule. Dans les complexes donnés par les Hp II avec Hb, le rapport Hb/ Hp II est le même que pour HpI . Les coefficients d'absorption des divers complexes, à 280 mμ (fraction protéique) et 406 mμ (hème) confirment que la réaction entre Hb et Hp est stoechiométrique (10, 7)

Mode d'union.

L'haptoglobine s'unit à la globine. Lorsque on fait entrer en compétition de l'hémoglobine native et de la globine, cette dernière bloque les groupements qui permettent la formation du complexe Hb-Hp (11).

La carboxyhémoglobine, la globine sont unies dans la même proportion que l'hémoglobine, oxydée ou réduite. De plus, les bandes caractéristiques d'absorption de l'hémoglobine sont identiques avant et après sa combinaison à Hp (7).

Nature de la liaison

On possède peu d'informations sur la nature de la liaison et les groupements par lesquels elle s'effectue.

Robert, Boussier et Jayle (12) pensent que les ponts disulfure ne jouent aucun rôle dans la réaction car Hp n'a pas de groupements SH libres, le complexe possède autant de groupements SH libres que Hb seule. Enfin, les métaux lourds Mg, Hg, Cu, n'inhibent pas la formation du complexe . (12).

Van Royen (11) croit que la réaction se produit entre les groupements aminés de Hb et les groupements carboxyliques de Hp car Hb dont les groupements aminés sont bloqués par le formaldéhyde ne forme pas de complexe.

Les hydrates de carbone : glucose, galactose, mannose, fructose, arabinose, lactose, saccharose, et xylose, n'inhibent pas la formation du complexe. Robert, Bajic et Jayle (12) pensent que les hydrates de carbone présents dans la molécule de Hp pourraient prendre part à la réaction de combinaison.

Quant à l'acide sialique, il ne joue aucun rôle dans la combinaison puisque après scission de 70 % de cet acide par la neuramindase (13), nous avons constaté que les propriétés peroxydasiques du complexe demeurent intactes.

L'affinité de Hp pour Hb est forte ; jusqu'ici le complexe n'a pu pratiquement être dissocié ; cette dissociation n'a été obtenue ni par addition de Hb ou de Hp en excès, ni même de globine native bien que l'affinité de Hp soit très forte pour cette dernière. Selon Bajic, (14) la stabilité prononcée du complexe ne peut être entièrement attribuée aux liaisons électrostatiques, l'action des forces de Van der Waals serait certaine. Malgré la forte stabilité du complexe Hb-Hp, il serait toutefois possible de le scinder partiellement avec de la glycine ou encore avec de l'héparine (15). Hp humaine possède la même affinité pour Hb de cheval, de veau, de lapin et d'un certain nombre d'animaux, que pour Hb humaine ou foetale (van Royen) (11). Ainsi certaines différences dans la structure de la globine ne semblent pas influencer de façon appréciable la formation du complexe, mais elles modifient son activité peroxydasique.

En résumé, la combinaison Hb-Hp est solide, mais on ignore pratiquement tout de la manière dont ces deux protéines s'unissent. C'est pourquoi nous avons voulu préciser les conditions de la formation du complexe et les facteurs qui modifient son activité.

2°)- TRAVAUX PERSONNELS

a/ Méthodes utilisées ; unités.

I. - Méthode peroxydasique de Jayle

Principe.

En présence d'hydroperoxyde d'éthyle, sous l'action du complexe hémoglobine-haptoglobine, l'iodure de potassium est oxydé en iode dans des conditions de température et de pH bien déterminées. L'iode libéré par la réaction est dosé par l'hyposulfite à la fin de la cinquième minute.

Mode opératoire.

On prépare une solution de Hb de cheval dont l'activité peroxydasique est supérieure à celle de Hb humaine. On l'amène au titre de 5.10^{-5}M en fer hématinique ou $1.25.10^{-5}$M en Hb (7).

Dans un creuset en porcelaine plongé dans un bain-marie à 32°, on mélange à 0.1 ml de la solution de Hb, un volume V de sérum inférieur à 0.1 ml, puis 3 ml d'une solution d'iodure de potassium O.1 M.

Dans un second creuset, on verse 1 ml d'hydroperoxyde d'éthyle O.1 M, 10 ml de tampon acéto-acétique à pH 4.4 et 0,5 ml d'une solution d'iode centinormale qui inhibe l'activité enzymatique de Hb libre.

On verse le contenu du deuxième dans le premier et l'on déclanche le chronomètre. Au out de 4 minutes 30 secondes, on ajoute 2 gouttes d'empois d'amidon : le liquide bleuit. On verse alors de l'hyposulfite de sodium 0.01 M jusqu'à décoloration complète qui doit être obtenu à la fin de la cinquième minute. Soit V_H le volume d'hyposulfite versé : il correspond à la quantité d'iode libérée par la réaction pendant ces cinq premières minutes.

On recommence une opération identique avec Hb seule, en absence de sérum ; elle exige un volume d'hyposulfite V_T ; c'est la valeur témoin. V_T correspond à :

-L'excès d'iode mis au début pour inhiber l'activité de Hb,

-l'iode libéré par Hb libre,

-l'iode libéré par action du peroxyde seul sur l'iodure de potassium.

Portons en ordonnées les valeurs $V_H - V_T$ correspondant à différents volumes V_S de sérum (en abscisses)(fig. 2).

La figure 2 montre les résultats. Pour des valeurs de V_S inférieures à X, la quantité d'iode libéré est proportionnelle à V_S ; pour des valeurs de V_S supérieures à X, elle reste constante et égale à $V_H - V_T = H$.

Le volume X de sérum est celui qui contient exactement la quantité de Hp nécessaire et suffisante pour saturer Hb contenue dans la prise initiale de 0.1 ml. Par définition, on appelle indice d'haptoglobine le rapport 0.1/X. On peut l'exprimer d'une façon différente, peut-être plus parlante. Soit c_1 la concentration en Hp d'un sérum qui sature volume à volume une solution de Hb de concentration c_2, l'indice est égal à c_1/c_2. Puisque c_2 est donné et fixe, on voit donc que l'indice Hp est fonction directe de la teneur du sérum en Hp.

Si, à une quantité fixe de Hb, on ajoute des quantités croissantes de Hp, on constate que l'activité peroxydasique du mélange est proportionnelle à Hp. Inversement, si à une quantité fixe de Hp, on ajoute des quantités croissantes de Hb, on constate que l'activité peroxydasique du mélange est proportionnelle à Hb. Jayle en déduit que Hp et Hb doivent s'unir molécule à molécule pour former le complexe Hb-Hp. Dans cette hypothèse, la concentration en Hp d'un sérum dont l'indice de Hp est égale à $1.25\ 10^{-5}$ M en Hp.

La titration par la méthode précédente dite " par saturation " est longue et délicate ; c'est pourquoi une seconde méthode dite " par activation " fut mise au point par Jayle . Son principe est le suivant :

Soit X le volume de sérum qui sature exactement 0.1 ml de solution de Hb $1.25.10^{-5}$ M. Par définition, l'indice de ce sérum est égal à 0.1/X. Soit h et H les volumes d'hyposulfite, correspondant aux quantités d'iode libérées par les volumes x et X de sérum . On a :

$$\frac{x}{X} = \frac{h}{H} \quad \text{ou} \quad X = x\ \frac{H}{h}$$

Puisque H est constant, il suffit donc d'un seul dosage avec prise d'essai x de sérum pour connaître X (Fig. 2)

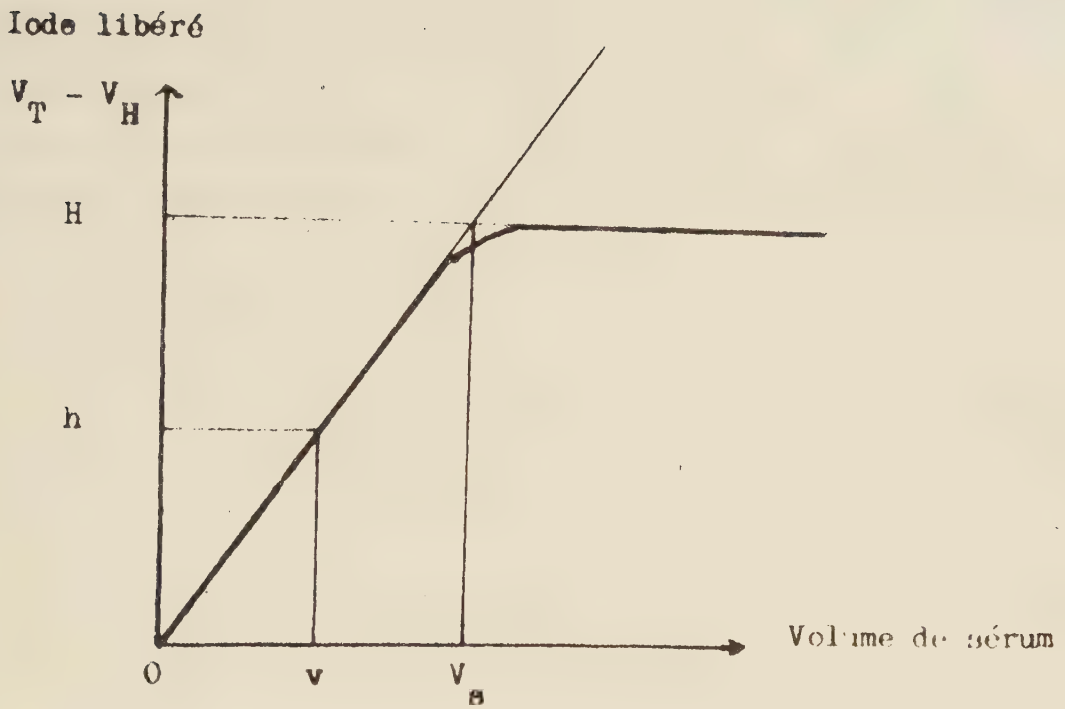

Figure 2. - Dosage de l'Haptoglobine, Méthode de Saturation (JAYLE).

2. - Méthode de dosage par électrophorèse sur papier (Nyman)

Principe

Elle utilise la propriété de l'haptoglobine de s'unir molécule à molécule à l'hémoglobine en formant un complexe dont le pH est égal à 4,85 tandis que celui de l'hémoglobine est de 6,9. Une simple électrophorèse sur papier permet donc de séparer les deux composés. A pH 7 l'hémoglobine non combinée demeure sur la ligne de départ où elle est mise en évidence par une coloration appropriée.

Appareils et réactifs.

-Cuve à électrophorèse (par exemple JOUAN, modèle CNRS).

-Papier Arches 304. Dimensions = 40 x 28 cm

-Tampon phosphate mono et disodique 0,01 M de pH 7,0 + 0,1.

-Solution stock de Hb de cheval titrée en Fe.

-Solution méthylique d'acétate de benzidine ou éthylique d'acétate de O-dianisidine ° :

100 mg o-dianisidine
70 ml éthanol
10 ml 1,5 M tampon acétate pH 4,7
18 ml eau distillée
2 ml H_2O_2 30%

- Eau oxygénée 0,06 % préparée extemporanément par dilution d'une solution stock 20 N type " électro" .

Mode opératoire

Sur une feuille 28 x 40 cm on trace sur une ligne parallèle au petit axe à 2 cm de celui-ci, huit traits de 1,5 cm de longueur, séparés entre eux par la même distance ; ces traits constituent les lignes de dépôt.

La feuille de papier, d'abord imbibée de tampon

° - Nyman utilise le vert leucomalachite

phosphate, est doucement essorée entre deux feuilles de papier filtre ; elle est alors placée dans l'appareil à électrophorèse, puis laissée au repos pendant 30 minutes de façon à équilibrer le papier avec la phase liquide.

Constituion d'une gamme d'hémoglobine

Par dilution de la solution-mère de Hb, on prépare une solution M/1000 en Fe dont on se servira pour constituer la gamme-étalon de Hb.
On sait que :

0,01 ml de Hb M/20.000 sature complétement 0,01 ml d'une solution de Hp contenant 1,3 g/l.

Il est alors facile de constituer par dilution une gamme de Hb.
Cette gamme est préparée tous les jours et placée à 4 ° C dans les tubes à hémolyse.

De chaque tube de la gamme ainsi constituée, on prélève 0,01 ml de Hb que l'on mélange dans un verre de montre à 0,1 ml de sérum à tester.
On obtient de la sorte une série de solutions contenant une quantité fixe de Hp et des quantités croissantes de Hb. On dépose 7 à 10 microlitres du mélange contenu dans chaque récipient sur la ligne de dépôt correspondante.

On soumet l'ensemble à une électrophorèse de 15 heures sous 125 v.
La feuille est ensuite séchée à l'étuve à 100° pendant 15 minutes, plongée dans la solution de benzidine (ou de o-dianisidine) préparée extemporanément, rincée à l'eau et séchée à la température de la pièce, entre deux feuilles de papier filtre.
Les régions contenant de Hb ou du complexe apparaissent sous forme de taches colorées.

Dans la méthode originale de M. Nyman, la gamme d'hémoglobine s'exprime en mg par ml et les concentrations d'haptoglobine en Hb. B. C. (cf p.14)

Interprétation des résultats.

La lecture des résultats doit se faire sur la feuille encore humide,

car la benzidine se décompose à la lumière. On recherche la première ligne de dépôt sur laquelle subsiste de l'Hb en excès, c'est-à-dire non combinée à Hp du sérum. L'indice de sérum recherché se situe donc entre la valeur pour laquelle on voit apparaître pour la première fois Hb en excès et celle qui la précède immédiatement.

3. - Méthode cinétique de Smithies

Principe

Comme la méthode de Jayle , elle utilise l'activité peroxydasique du complexe Hb-Hp. L'eau oxygénée y sert de substrat oxydant. L'oxygène libéré par la réaction oxyde le gaïacol donneur d'électrons qui se transforme en tétragaïacoquinone colorée dont l'absorption est suivie au spectrophotométre à 470 mu en fonction du temps, à 30°c.

Réactifs.

-H_2O_2 0,6 $\pm$ 0,005 M est préparée extemporanément à partir d'une solution stock 20 N type " Electro" conservée à + 2° et titrée toutes les semaines.

-Gaïacol, solution tamponnée (acéto-acétique) 0,03 M $\pm$ 0,001 M conservée à + 2, pH 4,0.

-Solution de méthemoglobine humaine 5.10^{-5} M en Fe hématique préparée selon l'une des méthodes les plus courantes.

Estimation de l'Hp d'un sérum.

Les réactifs sont placés au bain-marie à 30°. Le sérum à doser dilué 5 fois est mélangé à un volume égal de Met Hb humaine 5.10^{-5} en Fe ; on prélève 0,20 ml du mélange qui est pipeté dans la cuve 10 x 10 du spectrophotomètre thermostaté à 30°C On y ajoute 2,75 ml du gaïacol 0,03 M et au temps zéro, 0,050 ml d'H_2O_2 0,6 M rapidement mélangés au contenu de la cuve. On enregistre simultanément le temps et l'augmentation de la densité optique de la cuve à λ = 470 mμ.

On obtient ainsi une courbe, en ordonnées les densités optiques et en abcisses le temps en minutes. (fig.4). Elle présente une inflexion initiale, puis une partie rectiligne et un plateau terminal. La vitesse de la réaction est déterminée par le calcul de la pente de la portion rectiligne. Cette vitesse est proportionnelle, dans certaines limites, à la concentration en haptoglobine du sérum à doser.

Etalonnage

Ainsi, à des concentrations en haptoglobine croissantes correspondent des vitesses également croissantes. On trace la courbe des vitesses exprimées par l'accroissement de la densité optique par minute en fonction du taux d'haptoglobine. Smithies utilise l'Hb. B. C. comme unité.

UNITES

1. - Indice d'haptoglobine

Dans la méthode de saturation de Jayle, on l'a vu, on détermine le volume V_S de sérum ou de solution de Hp qui sature exactement l'Hb contenue dans 0,1 ml d'une solution M/80.000. On peut alors écrire :

V_S concentration du sérum en Hp = 0,1 x M/80.000 ou encore :

$$\frac{\text{Concentration en Hp}}{\text{Concentration en Hb}} = \frac{0,1}{V_S} = i \qquad (1)$$

Il est donc possible, connaissant V_S, de déterminer la concentration en Hp du sérum dosé. Pour en simplifier l'expression, M. F. Jayle a introduit la notion d'indice ou index de Hp. Par définition, l'unité d'index d'Hp est celui d'un sérum qui sature volume à volume une solution de Hb M/80.000. Comme le montre l'équation (1) ci-dessus, cet index est un rapport : il exprime combien de fois le sérum est plus (ou moins) concentré en Hp que l'est en Hb une solution de référence. Il fait abstraction du poids moléculaire des deux protéines ; il ne tient compte que d'un fait : leur union molécule à molécule.

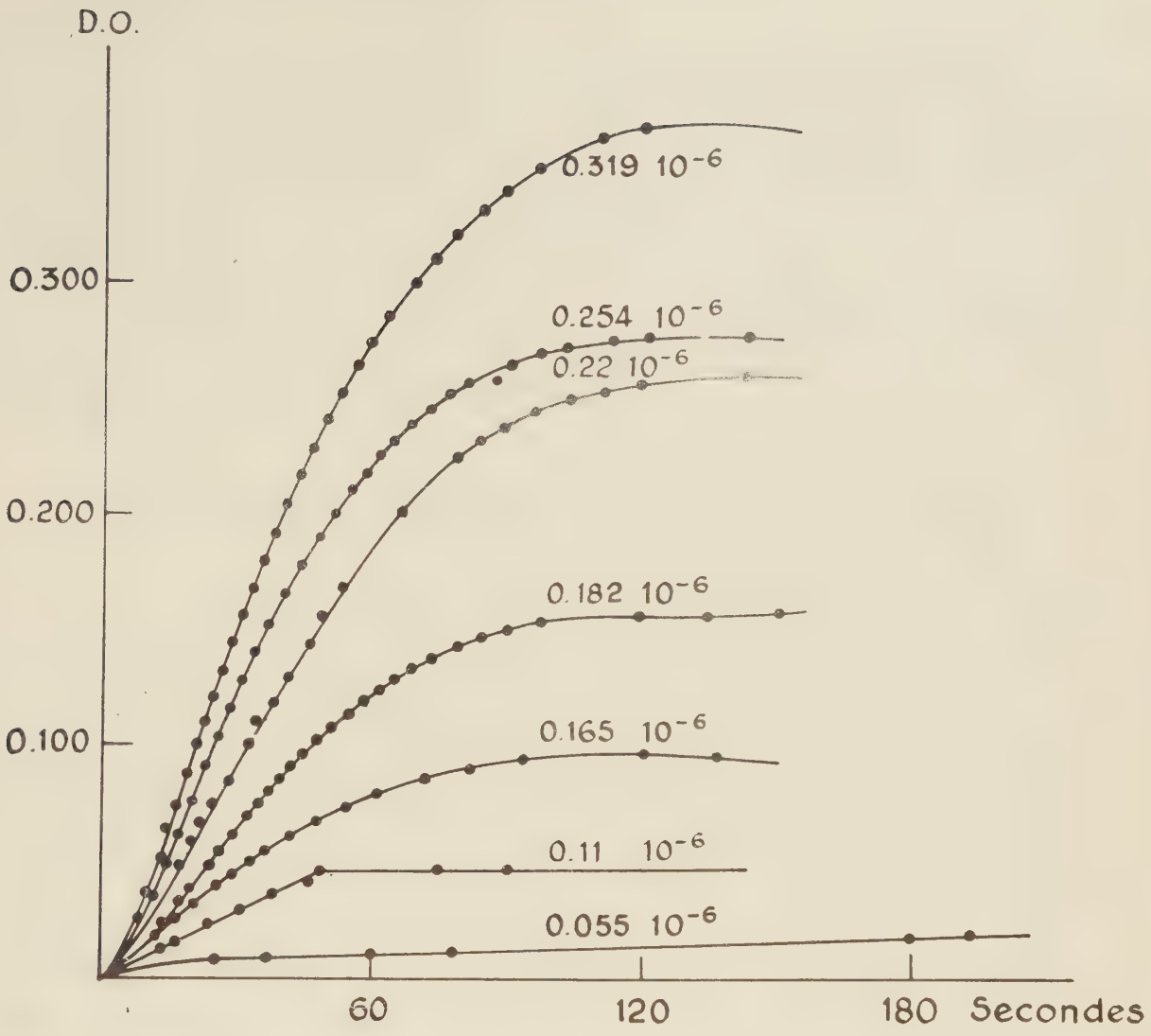

Figure 4 = Cinétique de la réaction entre le complexe Hb-Hp et l'eau oxygénée en présence de gaïacol pour différentes concentrations de complexe.

2. - Hb. B. C. = Hemoglobin Binding Capacity

Nymam (15) a introduit une autre manière d'exprimer les quantités d'Hp, adaptée à sa méthode électrophorétique de dosage. L'expression Hb. B. C. représente la quantité d'hémoglobine en mg qui peut être liée à l'haptoglobine présente dans 100 ml de la solution à titrer.

Il est aisé de passer de l'indice i de Jayle à l'HbB. C. de Nyman. Une solution M/80.000 de Hb contient 82,5 mg de Hb dans 100 ml . Il suffit donc de multiplier par ce chiffre l'indice i de Jayle.

3. - Expression en grammes par litre

Les deux manières précédentes d'exprimer la teneur d'un liquide en haptoglobine pouvaient se justifier lorsqu'on ignorait le poids moléculaire de Hp et son mode d'union à Hb. Il est actuellement établi que Hp 1-1 a un poids moléculaire de 90.000 à 10 % près et que sur 1 mg de Hb se fixe 1,3 $\pm$ 0,1 mg de Hp selon la réaction équimoléculaire Hb + Hp = Hb-Hp. En outre, la combinaison entre les haptoglobines Hp 2-1 et Hp 2-2 se fait dans le même rapport pondéral 1/1,3. En conséquence, il est rationnel de substituer aux conventions précédentes le taux de l'haptoglobine en grammes pour 1.000. A cet effet, il suffit de multiplier par 1,1 l'index d'haptoglobine tel qu'il est donné par la méthode de Jayle et par 0,013 la valeur exprimée en termes de Hb. B. C.

b/ Etude de la formation du complexe

Dans l'organisme, la combinaison se forme dès que de l'hémoglobine libre apparaît dans la circulation. C'est ce qui se produit au cours des maladies hémolytiques. Le complexe se forme donc à pH 7. C'est le même pH qu'utilise dans sa méthode de dosage électrophorétiqueM. Nyman. Par contre, Jayle et Smithies se placent en milieu nettement plus acide pour des raisons que nous verrons ultérieurement.

Il nous a paru utile de préciser les limites de pH dans lesquelles le complexe Hb-Hp se formait et conservait ses caractères électrophorétiques et peroxydasiques.

Méthode

Elle consite à soumettre à une électrophorèse sur papier, dans des tampons de force ionique constante et de pH variable, un mélange de Hb et de Hp. en solution dans le même tampon et au même pH que celui où se fera l'électrophorèse.

Dans la zone acide, nous avons utilisé le tampon suivant :

Acétate ac. Na Véronal sodique	}	0,1 M
ClH	N/10	
ClNa	N/10	

Dans la zone alcaline :

Glycocolle	M/10
ClNa	M/10
NaOH	0,1 N.

Nous avons fait varier le pH entre 2,5 et 11,5. Toutes les mesures ont été faites au 1/100ème d'unité.

Le complexe est préparé extemporanément à partir d'une solution de Hp purifiée et d'une solution de Hb de cheval. Il est amené au titre désiré par dilution dans le tampon choisi pour l'électrophorèse. Il n'y a pas de Hb en excès.

Sur quatre lignes de départ, on dépose successivement : 20 microlitres de Hp titrant 1,3 g/l

10 microlitres de complexe Hb-Hp

10 " de Hb titrant 5.10^{-5} M en Fe

10 " du complexe formé précédemment.

L'ensemble des bandes est soumis à une électrophorèse sous 120 V pendant 15 heures.

Après séchage, les bandes sont révélées de façon suivante :

- une bande de complexe et la bande d'hémoglobine sont colorées à la benzidine ou à l'orthodianizidine pour mettre en évidence leurs propriétés peroxydasiques ;
-une bande de complexe et la bande de Hp à l'amidoschwartz pour suivre le déplacement du complexe et de ses éléments constitutifs dont la mobilité est différente.

Résultats

La figure 3 résume les résultats obtenus.

Le complexe se forme normalement entre pH 3,9 et pH 11,5
Il constitue une bande distincte de celle de Hb, facilement identifiable.

A partir de pH 3,7 le complexe se scinde en deux parties.
La plus lente possède la mobilité de Hb seule déposée en regard.
La plus rapide est le complexe identifié par son action peroxydasique

La présence de Hb libre ne peut s'expliquer que par la formation incomplète du complexe Hb-Hp ou encore par sa dissociation, mais on la sait très difficile.

Or la bande de Hb libre ne cesse de croître dès lors que l'on se rapproche de pH encore plus acides. De plus, la coloration des bandes d'électrophorèse à l'amido-Schwartz permet de mettre en évidence vers la cathode une bande supplémentaire dont la migration est identique à celle de Hp pure. Donc, trois éments de la cathode à l'anode ; Hp, Hb , le complexe Hb-Hp. A pH 2,6 il n'existe qu'une seule bande. C'est Hb, il n'y a plus de complexe. On retrouve Hp à la cathode.

En milieu alcalin par contre, le complexe demeure entièrement formé. Nous l'avons trouvé intact et actif jusqu'à pH 11,5.Au delà, les mesures à l'électrode de verre perdent toute signification

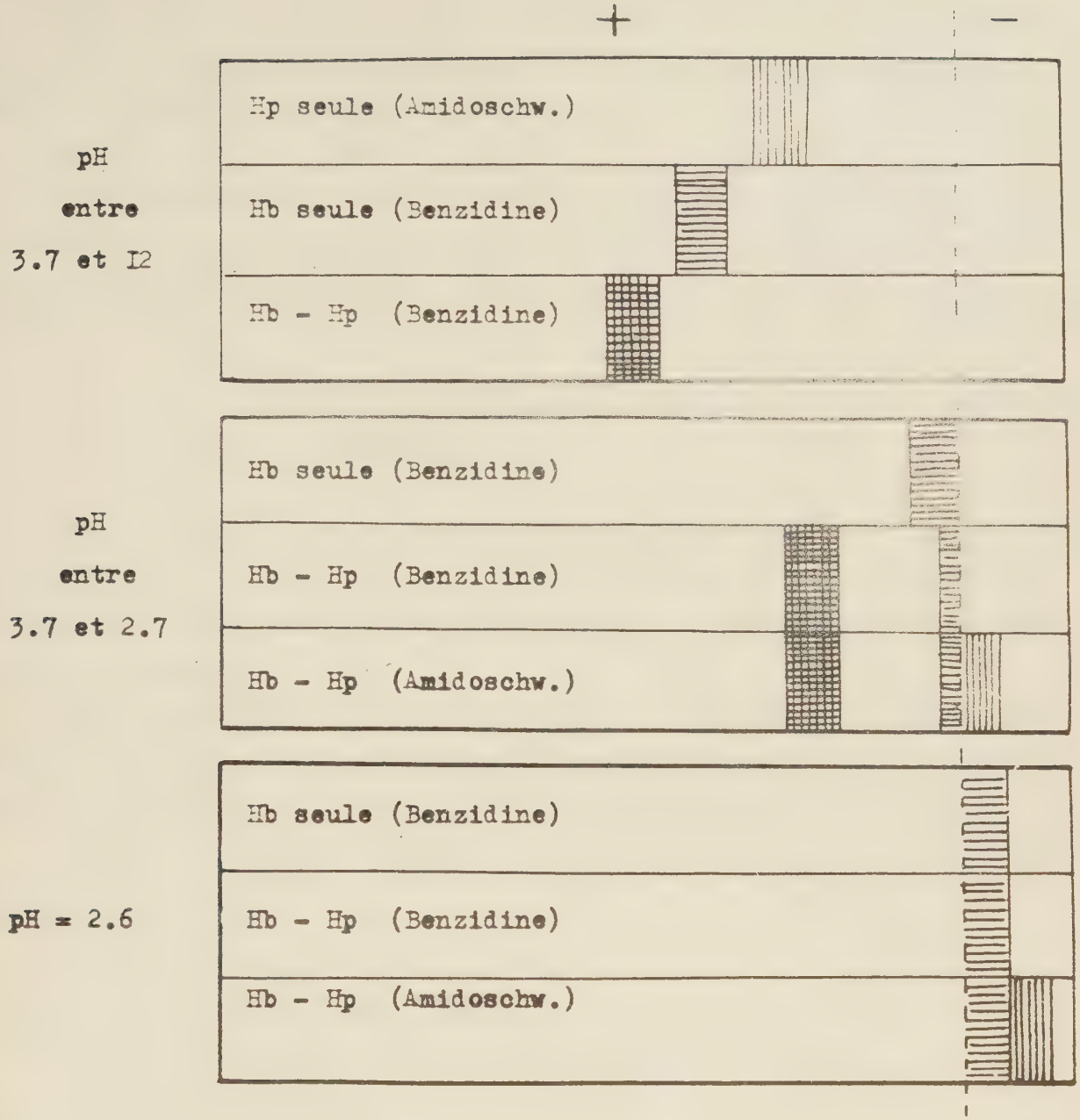

Figure 3.- Influence du pH sur la formation du complexe Hb - Hp. Electrophorèses à différents pH.

En résumé, en milieu acide, à partir de pH 3,7, il se forme demoins en moins de complexe. A pH 2,6, il ne s'en forme plus du tout ; en milieu alcalin, le complexe se constitue normalement.

En conclusion, le complexe Hb-Hp se forme et reste stable dans une gamme très étendue de pH = de 3,7 à 11. Ce fait n'est nullement en faveur d'une théorie électrostatique pour expliquer la liaison entre les deux protéines.

c/ -Influence de la nature du tampon et pH sur l'action du complexe

Les deux méthodes de Jayle et celle de Smithies utilisent des tampons à pH différents. Dans ces trois cas, en effet, il s'agit d'obtenir une activité peroxydasique négligeable de l'hémoglobine en excès pour une activité appréciable du complexe.

Nous avons étudié une série de tampons par la méthode d'activation de Jayle. Nous avons pû ainsi vérifier que l'activité peroxydasique du complexe variait non seulement avec le pH mais également avec la nature du tampon.

Les pH des tampons utilisés ont tous été mesurés au 1/100 ème près. Ils varient entre 3,5 et 5.

Tampons étudiés :

1.- Acétoacétique 0,1 M

2.- Citrique phosphodisodique 0,1 M

3.- Acide citrique 0,1 M

NaOH 0,1 N

HCl 0,1 N

4.- Acide acétique 0,1 N

pyridine

Mode opératoire

Nous avons utilisé la méthode d'activation de Jayle en remplaçant le tampon acéto-acétique habituel par le tampon à étudier. Toutes les déterminations ont été effectuées en triple ; les points expérimentaux ont été reportés sur les courbes où figurent en abcisses le pH et en ordonnées le nombre de ml d'hyposulfite versé dont on a retranché les volumes correspondant à l'activité de Hb seule . (Fig. 5)

Résultats

Les courbes obtenues montrent, pour chaque tampon, un pH où l'activité du complexe est maximun. Ce pH est compris dans tous les cas entre 4 et 4,2. Par contre, l'activité est très faible aux pH extrêmes 5 ou 3,5.

L'activité de l'hémoglobine seule a été également étudiée en fonction du pH. Elle est nulle ou très faible entre pH 3,5 et 4,3. Elle croît plus ou moins rapidement selon la nature du tampon. Sur les courbes, l'activité due au peroxyde d'éthyle a été déduite.

La nature du tampon utilisé intervient de façon très nette sur l'activité du complexe Hb-Hp. Avec le tampon acétate-acide acétique, on observe un maximun net, mais situé de façon légèrement différente pour le tampon pyridine ; pH 4,2 pour le tampon acéto-acétique, 4 pour le tampon pyridine acétique. De plus, la valeur de l'activité du complexe est plus forte dans le tampon acétique que dans le tampon pyridine-acétique.

Dans les tampons acide citrique-ClH-NaOH et acide citrique phosphodisodique, l'activité du complexe passe entre pH 4,1 et 4,3 par un maximun qui n'est pas très net mais qui présente sensiblement la même valeur pour ces deux tampons.

Par contre, l'activité de Hb seule varie sensiblement avec la nature du tampon, elle croît d'un tampon à l'autre dans l'ordre suivant :

-pyridine-acétique
-aceto-acétique
-citrate HCl
-citrate phosphodisodique.

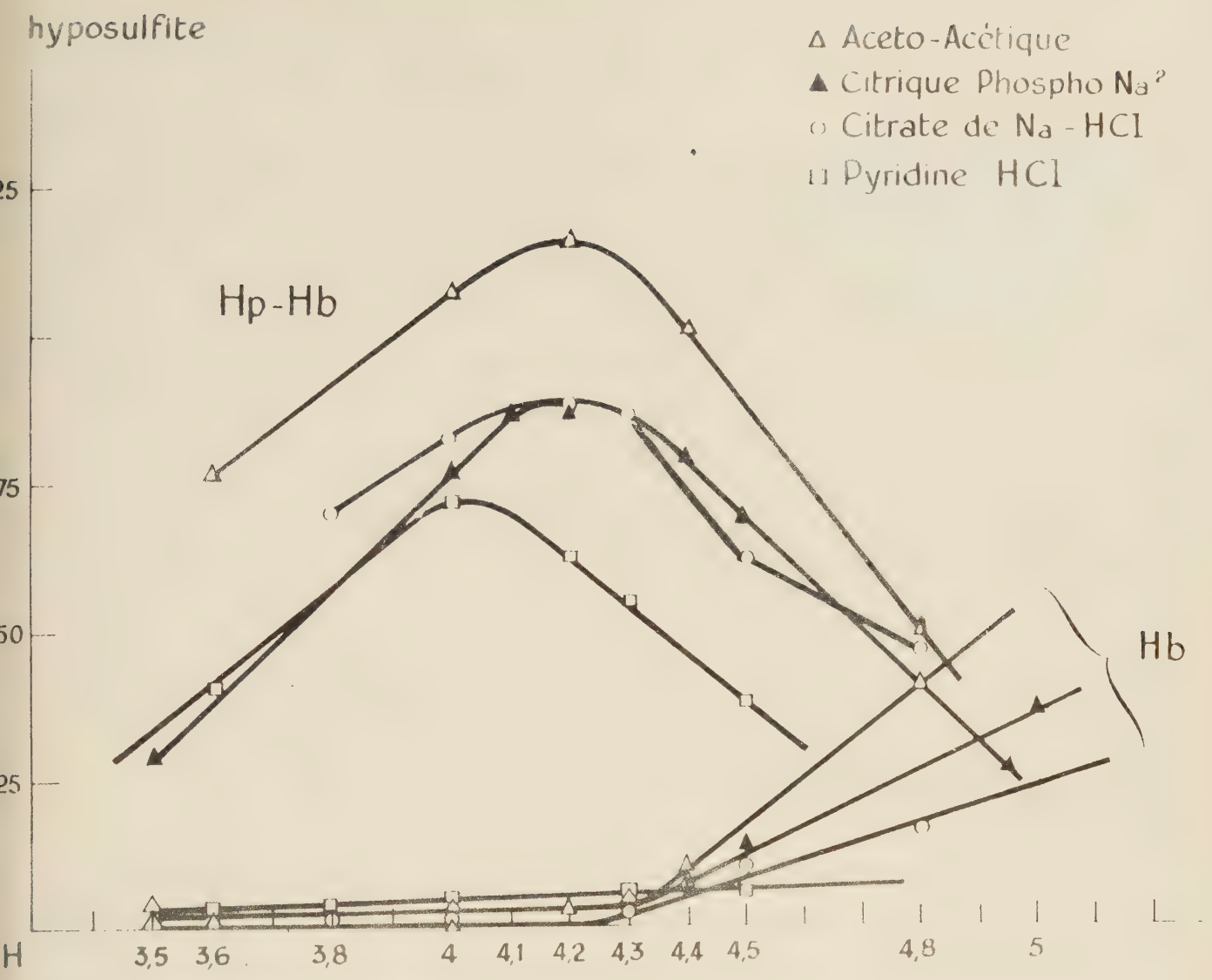

Figure 5 : Influence du pH et de la nature du tampon sur l'activité peroxydasique de l'Hb de cheval et du complexe Hb-Hp.

d/ . - Etat de l'hémoglobine

L'hémoglobine utilisée habituellement pour la formation du complexe est un mélange de carboxy et oxyhémoglobine. Il nous a paru intéressant de préparer des formes bien définies d'hémoglobine pour savoir si l'état du fer (combiné à 0_2, CO, H_2O) et sa valence (Fe^{+++} de la cyannethémoglobine) influençait l'activité peroxydasique du complexe (Fig. 6)

Nous avons donc étudié l'activité peroxydasique :

- de ces hémoglobines seules,
- de ces hémoglobines liées à Hp,

par la méthode d'activation de Jayle. Toutes les déterminations ont été faites au moins en double.

Préparation de l'hémoglobine.

Hb a été réduite par un courant d'azote

HbO_2 a été obtenue en faisant barboter un courant d'oxygène dans l'hémoglobine.

La cyanmethémoglobine a été préparée en ajoutant 25 mg de $Fe^{+++}(CN)_6K^3$ pour 100 mg de Hb ; après un repos de quelques heures, on ajoute encore 2,5 mg de CNK puis on dialyse quelques heures contre un tampon phosphate à pH 7. à 3 ° C.

Nous designerons par l'expression "volume-palier le volume d'hyposulfite 0,01 N correspondant à la quantité d'iode libéré en 5 minutes lorsque Hb de référence (0,1 ml M/ 80.000) est entièrement saturée par Hp. En principe ce volume- palier est constant ; il peut exceptionnellement diminuer dans certains cas (nous les verrons plus loin). Il ne peut évidemment jamais augmenter.

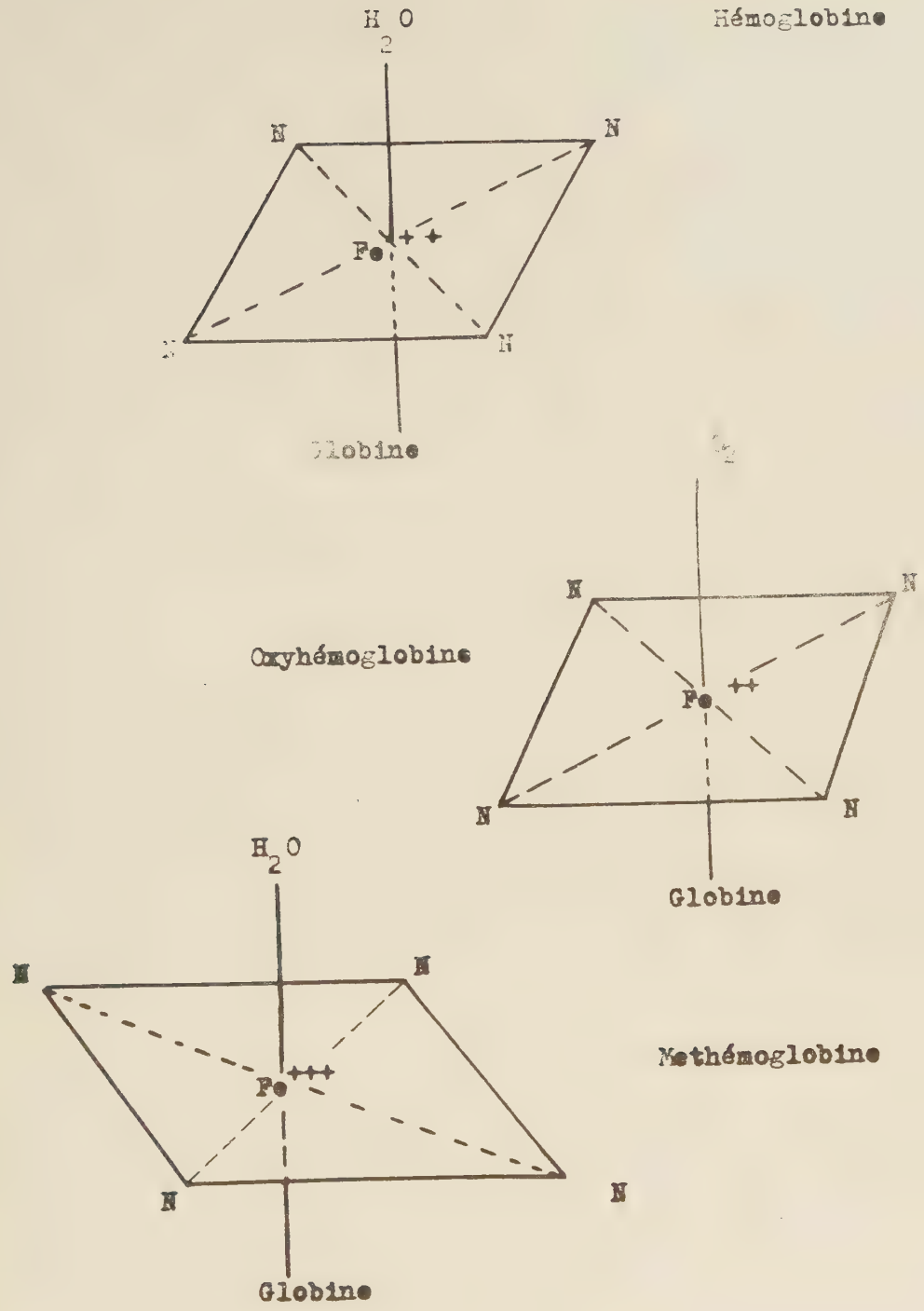

Figure 6. - Représentation spatiale de la position du Fer dans la molécule d'Hémoglobine, d'Oxyhémoglobine et de Méthémoglobine.

Résultats

Le tableau I rassemble les résultats obtenus. Dans la première colonne nous indiquons la nature de Hb. Dans la seconde et la troisième le volume de l'hyposulfite versé respectivement dans le cas de Hb seule et pour le complexe. Enfin, dans la dernière nous inscrivons le volume-palier.

De ce tableau, il résulte que Hb, $HbCO_2$ et leur mélange ont la même activité peroxydasique. Il en est de même pour les complexes formés avec ces hémoglobines. Seule, la cyanmethemoglobine se comporte différemment. A l'état libre, elle est plus active, au contraire, elle est moins active à l'état de complexe. Dans ce cas, elle donne un volume palier de 2 ml d'hyposulfite au lieu de 2,65 ml.

Si l'on calcule l'indice d'haptoglobine (méthode d'activation) avec ce chiffre de 2 ml, on retrouve la même valeur qu'avec les autres formes de Hb.

En conclusion :

- La détermination de l'indice de Hp ne dépend pas de la forme sous laquelle se trouve Hb pourvu que l'on tienne compte dans le calcul de la valeur exacte du volume palier.

Il reste à expliquer le fait que la CNMetHb ait un comportement différent Remarquons cependant que c'est le seul cas où nous avons modifié la valence du fer de Hb.

TABLEAU I

-Variation de l'activité de Hb et Hb-Hp avec la nature de l'hémoglobine utilisée

Hb de cheval 5 10^{-5} M en Fe

Hb 1,3 g/l

Nature de Hb	Activité de Hb seule en ml d'hyposulfite	Activité de Hb + Hp	Volume-palier
Mélange HbCO HbO_2	0,75 0,74	1,76 1,74	2,58 2,56
Met Hb CN	0,91 0,92	1,65 1,67 1,67	2 2,03
Hb O_2	0,73 0,74	1,74 1,75 1,74	2,56 2,57
Hb	0,74 0,75	1,73 1,75 1,76	2,56 2,58

COMPARAISON DES RESULTATS

Notre travail a porté sur 60 sérums tous pathologiques provenant de malades atteints d'affections très diverses : maladies d'Addison, Kahler, Hodgkin, polyarthrite chronique évolutive, cancers, pneumonie, schizophrénie.... Avec 35 sérums différents, nous avons comparé les résultats donnés par la méthode électrophorétique de Nyman et par la méthode d'activation de Jayle à ceux obtenus par la méthode de saturation de Jayle prise comme base de comparaison. Avec 25 autres sérums nous avons comparé la méthode cinétique de S mithies avec la méthode de saturation.

Nous étudierons d'abord la précision des diverses méthodes, leurs avantages, leurs inconvénients. Nous passerons ensuite à l'examen des résultats. proprement dits.

A. - Les méthodes : leur précision, leurs avantages et inconvénients

1°. - Méthode de Saturation

Elle repose sur la détermination de V_S

Mettons à part les erreurs commises en pipetant les solutions. La précision de cette méthode dépend donc de celle avec laquelle on peut connaître V_S. Pour cela, on effectue 3 dosages dont les points figuratifs déterminent la droite OA et 3 autres qui fixent la hauteur du palier AP. Le point A est déterminé par l'intersection de ces 2 droites. Il est bien évident que la précision avec laquelle on connaîtra ses coordonnées augmente avec le nombre de dosages effectués sur le même sérum.

De nos dosages répétés 10 fois sur le même sérum, il résulte que le volume V_S, correspondant au point anguleux A (fig. 2) est déterminé avec une erreur maximun de 5 %.

En réalité, la courbe de titration ne présente pas un point anguleux : au voisinage de A, elle s'arrondit en une courbe de raccordement tangente aux segments OA et AP. Mais ce fait, ne modifie en rien la précision avec laquelle on obtient le point d'intersection des 2 segments.

Cette méthode oblige à déterminer le volume-palier, dont la valeur permet de déceler un sérum ou un liquide biologique anormal. C'est donc un avantage réel. Pour nous, c'est la méthode de référence pour tout travail de recherche. Par contre, cette technique est longue, dont inutilisable pour de très grandes séries de dosages.

2°. - Méthode d'activation

D'après les triangles semblables de la figure 2, on a $\frac{h}{v} = \frac{H}{V}$.

Si nous mettons encore de côté les erreurs dues au titre des solutions l'erreur expérimentale sur la détermination de h dépend de celle commise sur V_s et sur H.

$$V_s = v. \quad \frac{H}{h} \quad \frac{\Delta v}{V_s} = \frac{\Delta h}{h} + \frac{\Delta H}{H}$$

Δ h et H dépendent de la goutte d'hyposulfite versée en plus ou en moins à la fin du dosage, et de l'erreur sur la lecture de la burette. Nous l'évaluons à 0,03 ml. L'erreur maximum dh est donc voisine de 3 à 4 % . L'erreur totale est donc au plus de 8 %.

Si cette méthode est, en gros, deux fois moins précise que la précédente, par contre, elle est bien plus rapide, puisqu'elle n'exige qu'une seule détermination.

Pour la majorité des sérums, le volume-palier correspond à 2,65 ml d'hyposulfite C_2H_5OOH ajouté au début de la réaction correspond, de son côté, à 0,65 ml d'hyposulfite. On a donc H = 2 ml. Si le sérum contient des substances inhibitrices, le volume-palier réel sera inférieur, et le calcul sera faux.

Nous avons dosé 20 fois un même sérum, à différentes concentrations. Les dilutions nécessaires ont été effectuées toutes les séries de 5. Contrairement à certains auteurs, nous n'avons pas trouvé d'influence de la dilution sur le taux d'haptoglobine.

La méthode d'activation est utilisée habituellement en clinique. Sa précision est amplement suffisante dans ce cas. Elle permet de grandes séries à un expérimentateur entrainé. Ses résultats ne sont pas exacts lorsque le volume palier d'un sérum différe sensiblement de 2, éventualité peu fréquente, mais dont il fallait souligner l'existence, nous y reviendrons plus loin.

3°. - Méthode d'électrophorèse de Nyman

Sa précision dépend d'abord de l'exactitude avec laquelle a été titrée la solution-mère de Hb. Pour cela, nous utilisons la méthode de Henry (18) qui dose spectrophotométriquement le fer héminique. La précision de ce dosage est $\pm$ 1 microgramme. L'intervalle qui sépare deux points de cette gamme intervient également. Sachant que 0,1 ml de Hb M/2000 en fer est saturé par 1 ml de sérum titrant 1 d'indice de Hp, nous avons directement étalonné notre gamme en indice. Notre intervalle était de 0,10 d'index soit de 0,13 g/l. Enfin, le choix du révélateur peut être un facteur limitant pour la précision du dosage. Nous avons eu à notre disposition des solutions de benzidine ou d'ortho-dianizidine. Bien que, selon OWEN, l'orthodianizidine soit susceptible de mettre en évidence des quantités de Hb quatre fois plus faibles que la benzidine (19) nous avons constaté qu'en pratique cette dernière est capable de révéler des différences de 0,13 g/l entre deux points de la gamme, alors que, pour l'orthodianizidine, ce seuil est abaissé à 0,065 g/l. Nous avons vu que le résultat donné par la feuille d'électrophorèse se situe entre une valeur en excès et une valeur en défaut. Il est parfois difficile de situer exactement ce point. De faibles quantités d'hémoglobine en excès forment des trainées en arrière du complexe. Pour toutes ces raisons, nous pensons que les résultats ne peuvent être donnés qu'à 0,10 g/l près.

Cette méthode est simple, elle ne nécessite ni H_2O_2, ni $C_2H_5O_2H$, ni appareillage particulier, ni de personnel spécialisé. Les faibles quantités déposées exigent cependant une manipulation très soigneuse. Lorsque le taux d'haptoglobine est élevé, il y a lieu de procéder à de nombreuses électrophorèses. C'est donc une méthode longue, valable pour de petites series et ne donnat pas de meilleurs résultats que la méthode d'activation de Jayle

4°. - Méthode cinétique de Smithies

La précision de la méthode, compte tenu des causes plus générales d'erreur (dosage des réactifs, sérum hémolysé), dépend de la mesure d'une pente, (donc du spectrophotomètre-enregistreur employé) et de l'étalonnage de la courbe de référence.

L'erreur maximum constatée sur le calcul de la pente n'a jamais dépassé $\pm$ 1 % pour des pentes qui ne sont pas trop faibles. Comme la méthode de Smithies ne permet pas de déterminer des taux d'haptoglobine inférieurs à 0,13 g/l, l'erreur est donc très faible.

Le calibrage de la courbe nous semble poser un problème plus sérieux Smithies (17) affirme que cet étalonnage est possible indifféremment avec de l'haptoglobine pure ou bien du sérum. Reprenant les travaux de J. Moretti et J. Yon (20) et en collaboration avec cette dernière, nous nous sommes attachés à l'étude cinétique du complexe Hb-Hp dans le système gaïacol-H_2O_2. Nos conclusions ne confirment pas celle de Smithies. Le calcul de l'énergie d'activation de la réaction, - énergie nécessaire au complexe enzyme-substrat (Hb-Hp - H_2O_2) pour franchir la barrière de potentiel de la réaction, -a montré une différence trop considérable entre le sérum et Hp purifiée pour que cette différence puisse être attribuée à l'erreur expérimentale et pour qu'un calibrage en Hp puisse convenir à un dosage de sérum.
(E_{Hp} = 85000 calories ; E sérum = 13500 calories). Il faut donc prendre garde, lors d'un dosage, d'établir une courbe d'étalonnage pour la protéine pure, et une autre lorsqu'on la dose dans le sérum. De toute façon cet étalonnage ne présente pas les garanties que vous offre la méthode de saturation de Jayle.

En conclusion, abstraction faite des erreurs de pipetage, de dilution, de titrage des solutions, l'erreur expérimentale de l'ordre de 1 % est majorée d'une quantité inconnue qui dépend de la façon dont on a étalonné la courbe de référence. Cette erreur est vraisemblablement du même ordre. Cette méthode est donc entachée d'une erreur maximum de 3 % ; elle est un peu plus précise que les autres ; ceci, répétons-le, en faisant abstraction des erreurs dues aux dilutions.

Les avantages de la méthode sont évidents. Très précise, sensible, elle constitue une méthode de recherche excellente à notre avis. En clinique, elle est assez longue, elle ne convient pas pour de grandes séries. Elle nécissite un appareillage complexe : spectrophotomètre-enregistreur, bien thermostaté, la fixité de la température est la première condition de la précison et de la reproductibilité d'une réaction enzymatique.
Enfin, H_2O_2 est un réactif instable et Smithies conseille de préparer des solutions fraîches toutes les 30 minutes. D'où perte de temps et nouvelles possibilités d'erreur.

B. - Comparaison des résultats obtenus

Avant de commencer une étude statistique de nos résultats quelques remarques s'imposent d'emblée.

Les résultats figurent sur le tableau I . Dans une colonne nous indiquons la nature du liquide biologique dosé : S = sérum ; P = liquide pleural ; A = liquide d'ascite. Dans les colonnes suivantes figurent les résultats fournis respectivement par la méthode d'activation, de saturation ou d'électrophorèse. La dernière colonne montre la valeur du volume-palier de chaque sérum ou liquide biologique.

a/ - Activation - Saturation.

Sur un total de 35 résultats, 15 correspondent parfaitement à l'erreur expérimentale près. Pour 19 autres, la valeur fournie par la méthode d'activation est inférieure à celle fournie par la méthode de saturation. On trouve enfin un seul résultat en sens inverse.

Comment peut-on expliquer ces différences alors qu'il s'agit de deux méthodes en fait identiques ? La cause n'est pas attribuables à une maladie particulière, car ces sérums proviennent de malades très divers.

Si nous examinons la valeur du volume-palier des sérums dosés, nous voyons que, pour 16 d'entre eux au moins, le volume-palier est anormalement bas. Or, nous l'avons vu, les résultats de la méthode d'activation sont calculés par rapport à un volume-palier égal à 2 ml Il est donc certain que l'on obtiendra un chiffre inférieur à la valeur réelle toutes les fois que ce plafond théorique ne sera pas atteint. Par contre, si l'on calcule l'indice de Hp en tenant compte du volume-palier réel, on obtient des résultats identiques par les deux méthodes.

Mais ceci ne nous indique pas pour quelle raison un certain nombre de liquides biologiques ont un volume-palier faible. S'agit-il de substances inhibitrices y préexistant ou bien consécutives à une thérapeutiques .... Il ne nous est pas possible de répondre à cette question. Signalons toutefois que liquides pleureux ou liquides d'ascite présentent systématiquement un volume-palier très bas, voisin de 1,50.

b/ - Saturation - Electrophorèse.

Nous avons obtenu 20 résultats concordants sur 35 sérums dosés, compte tenu de la précision de la méthode qui a été discutée plus haut. Restent 15 résultats qui se divisent à parties égales en résultats supérieurs et inférieurs, sans que l'on puisse en tirer des conclusions plus précises. Or, il s'agit le plus souvent de sérums qui ont été fortement dilués, 5 à 10 fois aussi bien pour le dosage par saturation que pour l'électrophorèse . En conséquence, l'erreur expériementale possible de 5 % se trouve automatiquement multipliée par le coefficient de dilution.

c/ - Saturation - Méthode cinétique

Nous avons opéré sur 25 sérums différents des précédents, car l'appareillage nécessaire n'a été en notre possession que plus tard. Nous n'indiquerons pas la valeur du volume-palier ; comme nous l'avons vu plus haut, il n'intervient pas dans la méthode cinétique (tableau).

La plus grande différence observée pour un même sérum est égale à 0,05 d'indice donc du même ordre de grandeur que l'erreur commise par la méthode de saturation. Dans un seul cas, la différence est en valeur absolue égale à 0,07 ; il s'agit d'un sérum d'indice 0,60. Or, lorsque l'indice d'un sérum dépasse 0,50, la méthode de Smithies n'est plus applicable, il est nécessaire de diluer l'échantillon.

TABLEAU I

Noms	Nature du liquide biologique	Activation	Saturation	électrophorèse	Volume palier
Blin...	S	1,03	1,25	1,07	1,52
Bou...	"	1,17	1,20	0,90	1,91
Leh...	"	0,89	0,95	0,90	1,87
Till	"	1,08	1,10	0,90	1,98
Gan...	"	1,02	1,17	0,95	1,84
Hag...	"	1,08	1;11	1,20	1,96
Pic...	"	0,84	0,86	0,75	1,92
Mil....	"	0,79	0,82	0,89	1,91
Mic...	"	0,91	1,02	0,95	1,57
Can	"	0,88	1,02	1,07	1,60
Sar...	"	0,99	0,8	1,7	1,92
Sed...	"	0,64	0,66	0,63	1,92

Noms	Nature	Activation	Saturation	Electro-	Volume palier
Lib...	S	0,98	1,03	1,43	1,91
Hei...	"	1,08	1,08	1,36	1,84
Pel...	"	1	1,10	1,29	1,92
183/k	A	1,02	1,20	1,29	1,55
Rou...	S	0,95	1,05	0,94	1,88
Pri...	"	1,	1,08	0,95	1,88
Per...	"	0,71	0,90	0,85	1,55
Lem...	"	0,86	0,90	0,76	1,85
Uze...	P	0,63	0,68	0,70	1,53
Ber...	A	0,57	0,64	0,62	1,57
Moe...	S	1,06	0,95	1,07	1,98
Lam...	"	0,74	0,74	0,70	1,97
Ric...	"	0,66	0,70	0,70	1,92

Bes...	S	0,83	0,83	0,73	1,92
Lej...	"	1,18	1,25	1,07	1,92
Ham..	"	0,71	0,79	0,90	1,86
X.....	"	1	1	0,80	1,98
Pin...	"	0,75	0,83	0,73	1,90
Val...	"	1	1,05	1,15	1,91
Jou...	"	0,93	0,95	0,90	1,85
Del...	"	1,11	1,11	1,07	1,98
Cha...	"	1,18	1,37	1,19	1,62
Vay...	"	0,81	0,81	0,90	1,99

TABLEAU II

Noms	Saturation	Smithies	Nature du liquide biologique
Deg...	0	0	S
Doz...	0,60	0,58	S
Moy...	0,50	0,51	"
Mic...	0,32	0,27	"
Cha...	0,50	0,50	"
X.....	0,14	0,17	"
Vig...	0,28	0,32	"
X.....	0,35	0,38	"
Aub...	0,50	0,52	"
Don...	0,60	0,57	"
Ros...	0,31	0,35	"

K.....	0,43	0,45	S
Ben...	0,60	0,53	"
Jac...	0,33	0,30	"
Gro...	0,50	0,49	"
Are...	0,30	0,32	"
Leu ...	0,30	0,34	"
Rou...	0,42	0,39	"
Rol...	0,60	0,57	"
Jub...	0,46	0,45	"
Lho...	0,60	0,54	"
Gru...	0,55	0,52	"
Kla...	0,40	0,37	"
Bro...	0,31	0,33	"

Etude statistique des résultats (1)

Le procédé de calcul utilisé fut le suivant :

- calcul de la somme des X, de la somme des Y, élévation au carré de ces sommes : X & Y, $(\sum X)^2$ & $(\sum Y)^2$;

-calcul de la moyenne des X, de la somme des carrés des Y : MY et MX;

MX = $\bar{X}$ MY = $\bar{Y}$

-calcul de la somme des carrés des X, de la somme des carrés des Y : $\sum X^2$ & $\sum Y^2$;

-calcul des écarts-types : $\sigma X = \sqrt{\frac{\Sigma X^2}{n} - \frac{(\Sigma X)^2}{n^2}}$

σY idem.

n = nombre de points ajustés.

-calcul du produit des X par les Y et somme de ces produits ; ΣXY ; calcul du produit de la somme des X par la somme des Y : $\sum X . \sum Y$

-calcul du coefficient de corrélation :

$$r = \frac{\frac{\sum xy}{n} - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n_2}}{\sigma(x)\ \sigma(y)}$$

-équation de régression :

$y = r \frac{\sigma(x)}{\sigma(y} x + My - r \frac{\sigma(y)}{\sigma(x)} Mx$ ou encore $Y = ax + B$

- calcul de la sédasticité :

$\sigma(\text{lié}) = \sigma y \sqrt{1 - r^2}$

Il faut préciser quelque peu la signification de ces calculs et les appréciations auxquelles ils conduisent :

- le coefficient de corrélation (r) nous renseigne sur le dégré de similitude en grandeur et en sens des variations entre les valeurs correspondantes de deux phénomènes. Les valeurs qu'il peut prendre dans le cas d'une corrélation parfaite sont $\pm$ 1 ;

(1) Le Docteur J. A. Bègue m'a apporté dans l'établissement de ces résultats une aide extrêmement efficace. Qu'il en soit ici remercié.

Il reste bien entendu que les écarts types

σx et σy

n'ont aucune signification en raison des dilutions différentes.
Au contraire, le σ lié a une grande signification (droites de sécurité) car il provient de la comparaison " horizontale" des résultats, c'est-à-dire pour une dilution identique.

- ici l'écart-type lié (σ lié) permet de donner les droites de sécurité qui seront d'autant plus proches de la droite de régression que les points expérimentaux ne s'en écartent pas trop.

D'après le mode de calcul, il est facile de voir que pour $r = \pm 1$ l'écart-type lié sera 0 et que les droites de sécurité seront confondues avec la droite de régression. Si $r = 0$, l'écart-type lié sera égal à σ (Y). Il convient dès lors de ne jamais perdre de vue la notion suivante ; il n'est pas possible de considérer séparément le coefficient de corrélation et l'écart-type lié.
Bien plus, si l'on veut qu'une corrélation soit satisfaisante.

il faut que la marge de sécurité soit très étroite pour être assuré d'une interdépendance rigoureuse. Cette exigence conduit à rejeter certains coefficients de corrélation en apparence satisfaisants parce qu'élevés, mais qui entrainent néanmoins une marge inacceptable. Un exemple va rapidement justifier cette assertion.

Choisissons :

$r = 0,90$ σ lié $= y \cdot \sqrt{1 - r^2} = \sigma y \cdot 0,436$

et $r = 0,80$ σ lié $= y \cdot \sqrt{1 - r^2} = \sigma y \cdot 0,6$

Les y seront d'une façon générale différents dans les deux cas.
Au relachement déjà obtenu (0,436 et 0,6) s'ajoutera celui résultant des produits par σy.

- Les calculs ultérieurs donnent des y $\#$ 0,20

des y $\#$ 0,3

pour des deux méthodes envisagées.

Ainsi :

$r = 0,90$ $\quad \sigma lié = y \cdot \sqrt{1-r^2}$

$\sigma y \# 0,1$ $\quad = 0,1 \cdot 0,436 = 0,0436$

$2\ \sigma$ liés $= 0,0872$

et $r = 0,80$ $\quad \sigma lié = \sigma y \cdot \sqrt{1-r^2}$

$y \# 0,3$ $\quad 0,3 \times 0,6 = 0,18$

$2\ \sigma$ liés $= 0,36$

-La différence des marges de sécurité :

$(0,36 \times 2) - (0,0872 \times 2) = 0,5456.$

permet d'apprécier en définitive la qualité de la corrélation d'une méthode par rapport à une deuxième et de justifier une préférence.

On peut donc retenir comme excellente la corrélation qui gravite autour de 0,90 tandis que 0,80 affirme encore une corrélation mais avec restriction quant à la sensibilité de la méthode.

On posera donc comme condition pour admettre une corrélation au rang de corrélation satisfaisante :

coefficient de corrélation élevé $(0,90) < r < 1.$

I) SATURATION - ACTIVATION

Voici un exemple détaillé des calculs :

x saturation

y activation

$\bar{y} = 0,9165$

$\bar{x} = 0,9714$

$\sigma y = 0,1828$ $\quad \sigma y = 0,1653$

$\sigma x^2 = 0,0334$ $\quad \sigma y^2 = 0,0273$

$\sigma y \ / \ \sigma x = 0,904$

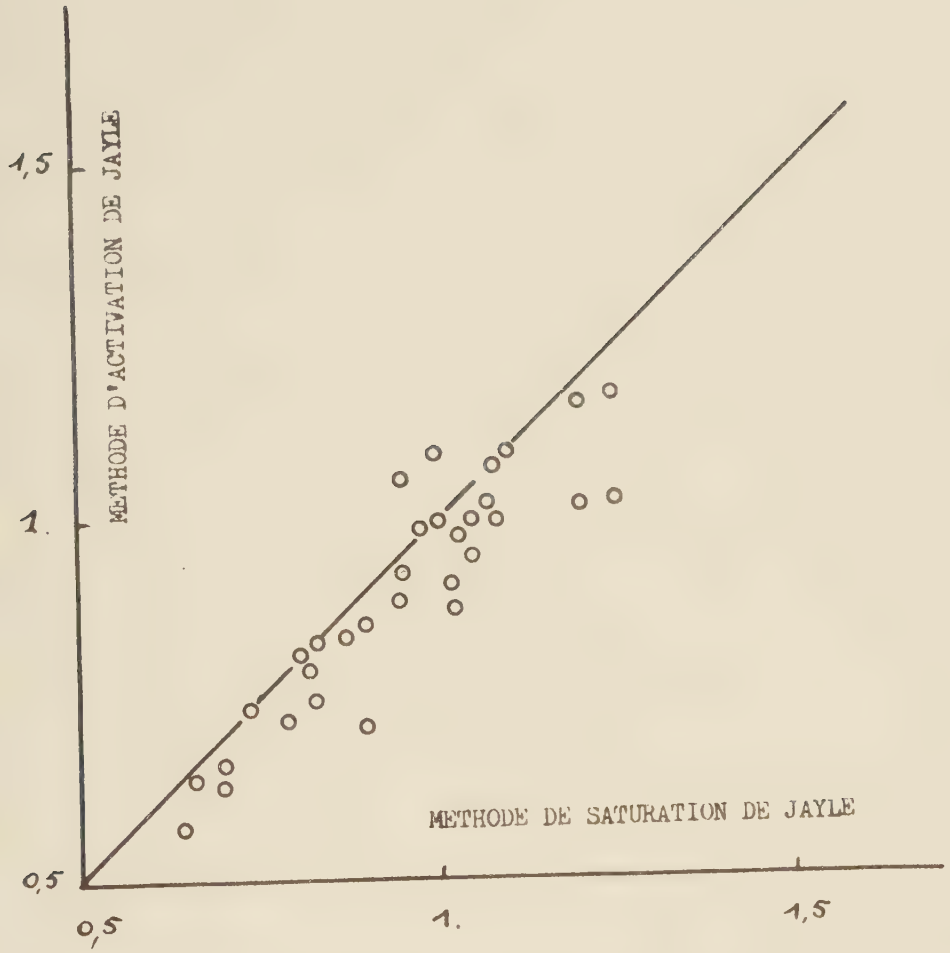

Figure 7 = Corrélation entre les résultats du dosage de l'Hp d'un même sérum , par deux méthodes différentes.

En abscisses : méthode de saturation de Jayle

En ordonnées : méthode d'activation de Jayle

$r = \frac{0,0273}{0,0302} = 0,9006$ $\qquad \sqrt{1 - r^2} = 0,1889$

$a = 0,9042 \times 0,9006 = 0,8143$

$b = 0,9165 - (0,9714 \times 0,8143) = + 0,1255$

σ lié $= 0,1653 \times 0,4347 = 0,0718$

2σ lié = (95 % points) $= 0,1436$

Equation de la droite de régression

$$y = 0,814\ x + 0,125 \pm 0,143$$

Pour ces deux méthodes le coefficient de corrélation est égal à 0,9006. La corrélation peut être considérée comme quasi excellente, de plus, la marge de sécurité est elle-même étroite.

II- SATURATION - ELECTROPHORESE

Nous avons obtenu ici σ lié $= 0,1870$

2σ liés sont 95 % des points $= 0,374$

L'équation de la droite de régression

$$y = (1,526\ x - 0,54) \pm 0,3740$$

Pour ces deux méthodes la corrélation est égale à 0,83 ce qui montre qu'il existe un lien entre les deux méthodes. Mais cette corrélation ne saurait être considérée comme excellente. En effet, la marge de sécurité est $\pm$ 0,374 soit un espace de 0,748. On peut exprimer une réserve quant à la sensibilité de la méthode d'électrophorèse mais nous avons déjà vu que le choix du colorant est important. En conclusion, le coefficient de corrélation est plus faible et la marge la plus lâche. De plus, il semble que l'approximation soit plus mauvaise lorsque les valeurs croissent.

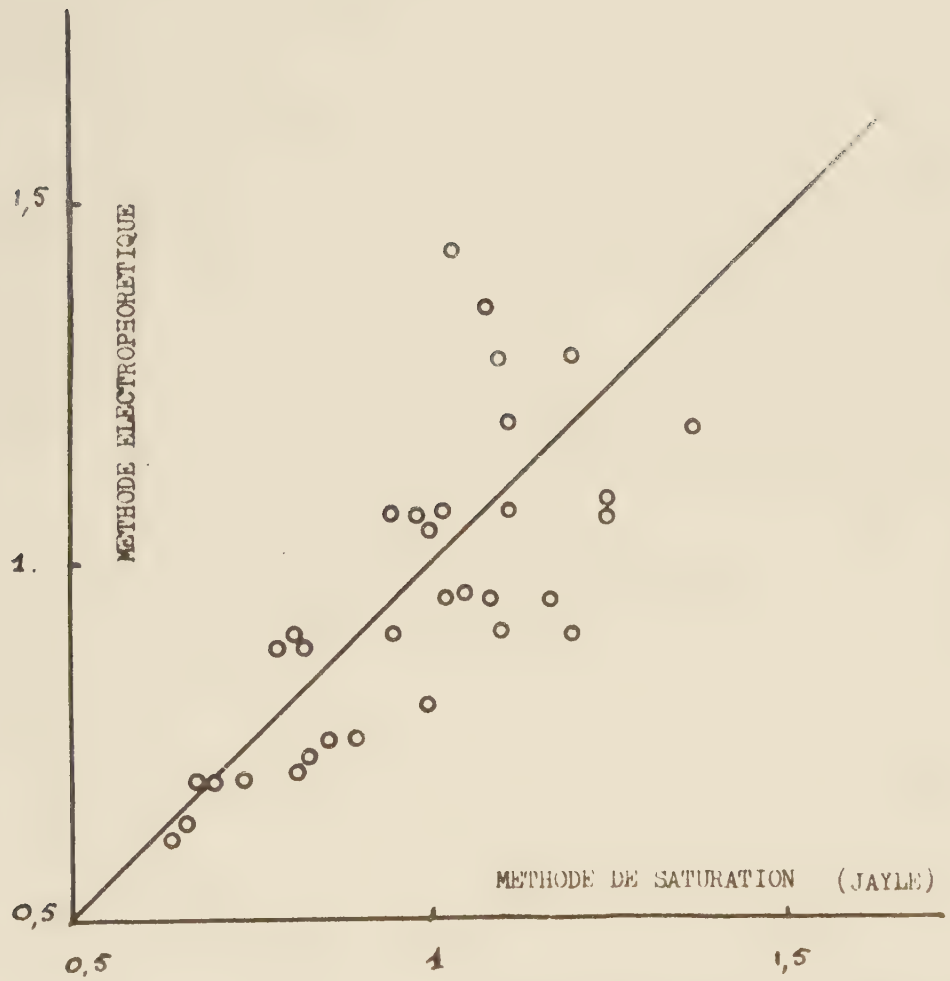

Figure 8 : Corrélation entre les résultats du dosage de l'Hp d'un même sérum par deux méthodes différentes.

En abscisses : méthode de saturation de Jayle

En ordonnées : méthode électrophorétique de Nyman

III - SATURATION- METHODE CINETIQUE

Nous trouvons σ lié = 0,0257

2σ lié = 0,051

L'équation de la droite de régression

$y = 0,81\ x + 0,072 \pm 0,051$

la corrélation est excellente : 0,97

La marge de sécurité très étroite $\pm$ 0,051 soit un espace de 0,102

Pour une mesure faite par la méthode de saturation 95 % des points correspondants obtenus par la méthode de Smithies se situent avec certitude dans la marge $\pm$ 0,051 pour des valeurs allant de 0,30 à 0,70

En conclusion, nous pouvons dire que la méthode de Smithies se rapproche plus que les autres des valeurs obtenues par la méthode de saturation de Jayle.

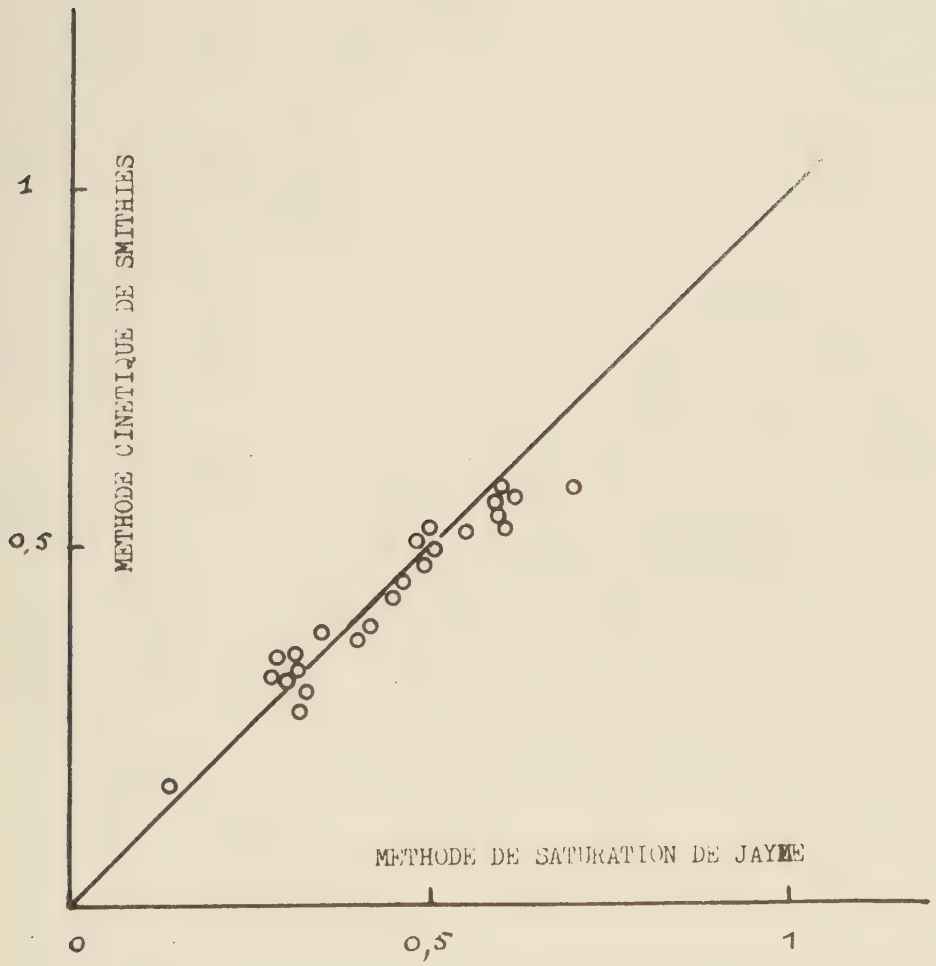

Figure 9 : Corrélation entre les résultats du dosage de l'Hp d'un même sérum par deux méthodes différentes

En abscisses : méthode de saturation de Jayle

En ordonnées : méthode cinétique de Smithies

RESUME ET CONCLUSIONS

Le but de ce travail était de comparer quatre méthodes permettant de doser l'haptoglobine dans le sérum ou d'autres liquides biologiques. Cette étude exigeait quelques recherches préalables sur la formation et les propriétés du complexe Hb-Hp utilisé dans les quatre méthodes étudiées.

Nous avons établi que l'hémoglobine s'unit à l'haptoglobine dans une zone de pH très étendue, comprise entre 3,7 et 11,5. Au dessous de 3,7 jusqu'à 2,6, le complexe se forme de moins en moins, la dénaturation des proteines augmentent avec l'abaissement du pH

Pour quatre tampons particuliers, nous avons recherché le pH optimumde l'activité peroxydasique du complexe. Ce pH varie entre 4,0 et 4,2. L'activité de l'hémoglobine seule, au contraier, pratiquement nulle aux pH inférieurs à pH 4,3 , s'élève ensuite avec le pH ; elle atteint un maximum à pH 5,6.

Nous avons comparé l'activité peroxydasique de l'hémoglobine à celle de l'oxyhémoglobine et de la cyanmethémoglobine. Pour une raison que nous n'avons pu élucider nous avons constaté que la cyanmethémoglobine dans le système hydroperoxyde d'éthyle-iodure de potassium, a une activité peroxydasique à l'état libre supérieure à celle de Hb et HbO^2 ; en revenche l'activité du complexe CNMetHb-Hp est plus faible que celle des autres complexes.

Nous avons comparé quatre méthodes de dosage de l'haptoglobine

-Méthode de saturation de M. F. JAYLE

-Méthode d'activation de M. F. JAYLE

-Méthode électrophorétique de M. NYMAN

-Méthode cinétique de SMITHIES

La prémière et la quatrième sont les plus précises : l'erreur commise est inférieure ou égale à 5 %. Elles sont longues et délicates : elles conviennent pour des travaux de recherche. La deuxième et la troisième sont moins précises : erreur de 8 à 10 %. La méthode d'activation est la plus rapide et la mieux adaptée à la routine clinique ; la méthode électrophorétique de Nyman est beaucoup plus longue et ne donne pas de meilleurs résultats.

Nous avons étudié la corrélation des résultats obtenus avec ces différentes méthodes en utilisant comme méthode de référence le dosage de l'haptoglobine par la méthode de saturation de M. F. JAYLE. Nous avons constaté

que la corrélation était excellente entre la méthode de saturation de M. F. JAYLE et la méthode cinétique de SMITHIES et satisfaisante avec la méthode d'activation de JAYLE.

Comme la méthode de Nyman est beaucoup plus longue que la méthode d'activation de Jayle ; c'est cette dernière qui est la mieux adaptée aux dosages de routine. Il faut cependant mentionner que la méthode de Smithies peut être considérablement simplifiée mais nous n'avons pas encore assez d'expérience sur la précision et la reproductibilité des techniques qui en dérivent.

Toutefois il existe dans certains liquides biologiques une ou plusieurs substances qui perturbent le dosage par les méthodes qui mettent en jeu l'activité peroxydasique du complex Hb-Hp. La cause de ce phénomène n'a pas été tirée au clair.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. POLONOVSKI M., JAYLE M. F. : Existence dans le sérum d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hémoglobine. C.R. Soc. Biol. 129, 457, 1938.
2. JAYLE M. F. : Etude biochimique et physiopathologique des peroxydases animales. Thèse Paris 1939.
3. JAYLE. M. F. : Evaluation moléculaire de Hp par une réaction enzymatique de peroxydation. C. R. Acad. Sc. 211,574, 1940.
4. JAYLE M. F. et GILLARD P. : Précipitation saline d'une protéine définie dans un mélange hétérogène. Bull. Soc. Chim. Biol. 29, 149, 1947.
5. JAYLE M. F. , BOUSSIER G. : Obtention à l'état homogène d'une mucoprotéine sérique, l'haptoglobine. Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 959, 1954.
6. BOUSSIER G., MORETTI J., JAYLE M. F. : Etude de l'haptoglobine Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 817, 1960
7. BOUSSIER G., MORETTI J., JAYLE M. F. : Etude de l'haptoglobine Bull. Sic. Chim. Biol. 42 837, 1960.
8. CHEFTEL R. I. , CLOAREC L., MORETTI J. , RAFELSON M. , JAYLE M. F. : Etude de l'haptoglobine. Bull. Chim. Biol. 42 993, 1960.
9. SMITHIES O. : Zone électrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. 61, 629, 1955.
10. GUINAND S. , TONNELAT J., BOUSSIER G., JAYLE M. F. : Propriétés physiques de l'haptogobine serummucoïde α_2 et de sa combinaison hémoglobinique. Bull. Soc. Chim Biol. 38 , 239, 1956
11. VAN ROYEN A. A. H. : Het Haptoglobin, een bijdrage tot de kennis der alpha globulinen. Delf 1950. Thèse.
12. ROBERT L., BOUSSIER G. et JAYLE M. F. : Groupements sulfhydriques de l'haptoglobine et de sa combinaison avec l'hémoglobine. Exper. 13, 111, 1957.

12a ROBERT L., BAJIC V. , JAYLE M.F. ; Action de certains glucides et polyelectrolytes sur la combinaison de l'hémoglobine avec l'haptoglobine sérique et son activité catalytique. C. R. Acad. Sc. 242, 2868, 1956.

13. RAFELSON M.E. Jr., CLOAREC L., MORETTI J. et JAYLE M.F. : Action of neuraminidase on haptoglobin. Nature 191, 279, 1961.

14. BAJIC V. : Etude du mécanisme de formation du complexe hémoglobine haptoglobine et son activité catalytique. Thèse Paris 1958.

15. NYMAN M. : Serum Haptoglobin . Scand. J. of Clin. and Lab. Invest. n° 39, vol. II, 1959.

16. JAYLE M.F. : Méthode de dosage de l'haptoglobine sérique. Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 876, 1951.

17. CONNELL G.E. and SMITHIES O. : Human Haptoglobin estimation and purification. Biochem. J. 72, 115, 1959.

18. HENRY R. Méthode de dosage du fer héminique Ann. Biol. Chim. 3, 101, 1945.

19. J. MORETTI et J. YON . Etude cinétique de l'activité peroxydasique du complexe hémoglobine haptoglobine Bioch. et Bioph Acta 46, 545, 1961

Vu le Président de Thèse
Professeur J. M. JAYLE

Vu le Doyen de la Faculté
de Médecine de Paris

Vu le Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE